BULLETIN DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
2e Série — Tome 35 — N° 5, 1963, pp. 507-514.

MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTION DE LA VITAMINE B_{12} *SUR LA SURVIE D'*ARTEMIA SALINA

Par Mlle Arantxa HERNANDORENA

La productivité des océans fut longtemps attribuée aux seuls facteurs physiques, température et lumière (C. O. D. Iselin, 1939), aux facteurs minéraux, nitrates et phosphates (Brandt, 1899), et les différences d'activité biologique des eaux de mer aux variations de la concentration de ces sels (S. M. Marshall & A. P. Orr, 1927 ; H. W. Harvey, L. H. N. Cooper, M. N. Lebour & F. S. Russel, 1935 ; A. G. Riley, 1947 ; W. T. Edmonson, 1956).

La mise en évidence des besoins hétérotrophiques des Algues constitue la première étape de la découverte des facteurs de croissance autres que minéraux. En effet, « il est raisonnable de supposer que si un organisme (marin) exige *in vitro* un facteur de croissance, ce métabolite ou son équivalent physiologique se trouve dans l'eau de mer en quantité significative » (L. Provasoli, I. J. Pinter, 1953).

En 1935, A. Lwoff et E. Lederer suggèrent la présence de « facteurs de croissance » dans l'extrait de terre nécessaire à la croissance de Flagellés. En 1938, A. Lwoff et Dusi mettent en évidence, pour la première fois, le besoin en thiamine de quelques Flagellés. Harvey (1939) montre qu'une eau de mer enrichie en phosphate, nitrate et fer ne permet pas la croissance continue de *Ditylium brightwelli*. Il suggère la nécessité d'un facteur probablement organique.

L'eau de mer contient donc des matières organiques dont le rôle possible dans l'écologie marine est postulé par Lucas dès 1938. En 1949, les connaissances acquises dans différents domaines de la biologie permettent à C. E. Lucas de formuler le concept de l'existence de relations écologiques plus subtiles que celles imposées par l'environnement inerte ou les prédateurs. Ces relations sont déterminées par des substances organiques provenant de l'activité métabolique des organismes. On les appelle « ectocrines », par opposition aux substances endocrines agissant à l'intérieur des organismes qui les ont sécrétées.

Au cours des années suivantes, les besoins vitaminiques de nombreuses Algues sont mis en évidence, la thiamine et la vitamine B_{12} étant le plus souvent requises. Les travaux de D. P. Wilson (1954) confirment bientôt le rôle des métabolites externes dans l'écologie larvaire : la métamorphose des larves pélagiques étant directement déterminée par la nature biochimique du substratum.

En 1957, KIRSCHENBLATT propose le terme de « télergones », pour désigner « des substances biologiquement actives sécrétées par les organismes dans leur milieu environnant et influençant d'autres organismes ».

Nous nous proposons d'étudier certaines de ces substances susceptibles de jouer le rôle de télergones sur un Invertébré marin, *Artemia salina*, Crustacé branchiopode.

La possibilité d'en disposer pendant toute l'année en quantité voulue, à partir des œufs durables trouvés dans le commerce, son cycle de reproduction rapide, son pouvoir d'adaptation aux variations de température et de salinité font d'*Artemia* un excellent animal de laboratoire marin. C'est pourquoi nous l'avons choisi comme animal de bioessais.

Avant d'étudier l'action de certaines « télergones » sur *Artemia*, nous avons recherché si le développement de ce Crustacé est sensible à des concentrations extrêmement faibles d'une substance présente dans l'eau de mer en quantité variable : la vitamine B_{12}, et si, par suite, ce développement peut représenter un test valable, au moins pour certaines substances. Ce travail présentait d'ailleurs un intérêt autre que méthodologique, puisqu'on ignorait jusqu'à présent le besoin des Crustacés en B_{12}. Les quelques recherches consacrées jusqu'à ce jour aux besoins de certaines Algues en cette vitamine font pressentir l'importance écologique de la B_{12} dans la vie marine. Les auteurs s'accordent pour situer la dose de vitamine présente dans l'eau de mer entre 0,005 et 0,01 γ ‰. Ces doses varient selon le lieu, la profondeur et la saison (C. B. COWEY, 1956 ; M. R. DROOP, 1957 ; K. W. DAISLEY & L. R. FISHER, 1958 ; K. KASHIWADA, D. KAKIMOTO, A. KASANAWA, 1960 ; D. W. MENZEL & J. P. SPAETH, 1962).

La majorité des Algues isolées nécessitent la vitamine B_{12}, mais il semble, d'après les travaux de L. PROVASOLI (1960), M. R. DROOP (1957) et H. S. VISHNIAC & G. A. RILEY (1961), que l'eau de mer soit pourvue d'une quantité suffisante de B_{12}, ce qui exclut cette vitamine en tant que facteur limitant du phytoplancton. R. R. L. GUILLARD et V. CASSIE (1963) suggèrent que, pour une espèce donnée, la quantité totale de vitamine présente pendant la période de croissance d'une population de Diatomées peut avoir moins d'importance que la présence de la vitamine à une période donnée, à des concentrations adéquates.

H. TOZAWA et J. SAGARA (1961) ont mis en évidence une capacité d'absorption active de la vitamine B_{12} par *Tapes japonica*. On peut donc penser qu'une véritable compétition existe, parmi les populations naturelles, entre différents organismes nécessitant la B_{12}, et les auteurs s'accordent pour préconiser des recherches plus approfondies sur les producteurs et les consommateurs de B_{12} (L. PROVASOLI, 1960 et K. W. DAISLEY, 1957).

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Toute la verrerie utilisée est soigneusement stérilisée. Les élevages sont réalisés dans des erlens de 250 cc. aux trois-quarts immergés dans

un bain-marin à 25° c. et contenant 150 cc. de milieu. Un éclairage uniforme est assuré par des tubes fluorescents. Dans le cadre de nos recherches, il était préférable d'utiliser un aliment non vivant, donc ne réagissant pas à la composition du milieu. La nutrition est assurée par des biscuits pulvérisés pour rats, élevage U.A.R., n° 3, dont la formule est la suivante :

céréales	48 %
issues	20 %
tourteaux expellers	13 %
farine d'origine animale	6 %
activateurs de croissance	10 %
composé minéral vitaminisé	3 %

L'analyse de cet aliment en vitamine B_{12} donne les valeurs suivantes :

0,02 γ cyanocobalamine par gramme de régime
0,04 γ hydroxycobalamine » »[1]

Nous apportions 135 mg pour 1 000 cc de milieu. L'inconvénient de ce mode d'alimentation est qu'il oblige à une oxygénation artificielle. Nous avons choisi la méthode proposée par J. Dutrieu (1960) : chaque jour, un courant d'oxygène pur est établi dans chaque milieu pendant 2 à 3 minutes.

Pour la désinfection des œufs, L. Provasoli, K. Shiraishi et J. R. Lance (1959) utilisent une solution de merthiolate à 1 pour 1 000. Nous avons utilisé la même méthode que ces auteurs, mais en employant du merseptyl au lieu du merthiolate. Toutefois, le merseptyl à cette même dose est toxique et les nauplii meurent dès l'éclosion. Nous avons été obligés de diluer le désinfectant à 100 mg pour 1 000.

Les œufs sont mis à éclore dans l'eau de mer stérile naturelle ou artificielle à 25°. 24 heures après l'apparition du premier nauplius, 50 nauplii sont reportés dans les différents milieux. Nous avons d'abord reporté le même nombre d'individus dans chaque milieu au début de la deuxième semaine de développement, le % de mortalité de la deuxième semaine étant plus significatif, puisqu'il correspond à une période critique : le stade IV petit. Mais la vitesse de croissance n'étant pas toujours exactement la même, il est préférable d'avoir le même nombre de larves dès le stade nauplius.

Chaque milieu est préparé en deux exemplaires et seuls sont retenus les résultats concordants dans l'un et l'autre des milieux. Les observations sont faites toutes les 24 heures ; la détermination des stades se fait à la loupe, selon la nomenclature de L. Provasoli et K. Shiraishi (1959). Comme ces auteurs, nous avons déterminé l'effet de la vitamine ajoutée par le nombre de jours nécessaires pour atteindre le stade IV petit et le stade adulte, qui correspondent, d'après D. T. Mason (1963), à des périodes où le taux de croissance est plus rapide et dépend plus

1. Nous remercions Mlle Y. Thuillier, qui a bien voulu effectuer les dosages de vitamine B_{12} dans ce régime par la méthode de diffusion basée sur la croissance d'une souche d'*Escherichia Coli* B_{12} dépendant.

étroitement de la quantité de nourriture apportée. Mais nous avons ajouté le tableau du pourcentage de mortalité établi chaque semaine au moment du renouvellement du milieu. Les larves sont transférées à l'aide de pipettes effilées, reliées à la bouche par un tube. L. PROVASOLI et K. SHIRAISHI (1959) n'ont pas utilisé la référence du % de mortalité, étant donné l'apparition dans leurs élevages d'individus atteints de la « maladie noire », caractérisée par l'apparition de taches mélaniques sur les appendices, maladie dont ils n'ont pas pu déterminer la cause et les effets sur la santé des larves [1].

Le besoin de vitamine B_{12} a été mis en évidence dans une eau de mer artificielle normalisée, additionnée ou non de différentes doses de vitamine B_{12}. Nous avons repris la formule proposée par J. DUTRIEU (1960) sans la surcharge en NaCl.

ClNa	30 g
Cl_2Mg	5
SO_4Na_2	2,5
ClK	0,6
Cl_2Ca	1
CO_3H Na	0,2
Br K	0,1
B O_3H_3	0,4
eau distillée	1000 cc

D'autre part, nous avons ajouté de la B_{12} dans une eau de mer provenant de Roscoff, afin de déterminer si la quantité de vitamine présente naturellement dans cette eau est suffisante pour assurer la croissance optimale d'*Artemia*. L'eau de mer est filtrée sur verre fritté (porosité 4) dès son arrivée au laboratoire, conservée dans une pièce froide, et n'est jamais utilisée avant la 4e semaine de stockage au laboratoire.

La vitamine B_{12} utilisée pour ces expériences provient des Laboratoires Labaz (Paris).

RÉSULTATS.

Nous reportons dans le tableau I les résultats des expériences préliminaires qui nous ont incité à étudier de plus près l'effet de la vitamine B_{12}.

Cinquante larves ont été reportées dans chaque milieu au début de la deuxième semaine de développement.

1. Nous avons également observé des individus atteints de cette maladie et nous pensons qu'elle est liée à l'opération de transfert des *Artemia* à l'aide de pipettes effilées qui risquent de blesser les appendices. En effet, nous avons pu, en piquant les individus à l'aide de pointes, provoquer l'apparition de ces taches mélaniques. La piqûre provoque une hémorragie, qui est stoppée par l'agglutination des corpuscules sanguins. C'est à ce niveau que se produit la réaction de mélanisation, par l'action de la tyrosinase libérée pendant la coagulation sur la tyrosine libre présente dans l'hémolymphe (T. W. GOODWIN, 1960 ; K. G. PINKEY, 1930).
Après cette observation, nous avons pris le soin d'utiliser des pipettes rodées et parfaitement calibrées selon le stade des individus à transférer. Dans ces conditions et jusqu'alors, la maladie n'apparaît plus.

Nous constatons que l'élevage en E.M.A. est moins satisfaisant qu'en E.M.N. Les auteurs ont souvent observé que le développement des organismes marins est meilleur en E.M.N., qui possède, selon l'expression employée par l'un d'eux, « un élan vital » qui fait défaut à l'E.M.A. (J. W. Atz).

Tableau I.

Répartition des stades des individus en fonction du milieu d'élevage après 21 jours de développement.

Milieux	Stades			Total
	IV Moy.-Grd.	Juvéniles	Adultes	
E.M.N. témoins	6	12	30	48
E.M.A. témoins	2	11	23	36
E.M.N. + vit. B_{12} 10 γ ‰	14	18	29	61
E.M.A. + vit. B_{12} 10 γ ‰	27	30	20	77
E.M.A. + vit. B_{12} 0,01 γ ‰	26	25	22	73

L'addition de vitamine B_{12} n'accélère pas la vitesse de croissance : le stade IV petit est atteint en 8 jours et le stade adulte en 21 jours, mais elle permet la survie d'individus qui meurent dans les milieux témoins E.M.A. et E.M.N.

Une même dose de vitamine a une action plus forte en E.M.A. qu'en E.M.N., ce qui peut s'expliquer par un état de déficience accusé des organismes en E.M.A., état très probablement dû pro parte à une carence de cette eau en vitamine B_{12}.

Toutefois, les doses étudiées sont très fortes par rapport aux doses existant normalement dans l'E.M.N.

C'est pourquoi nous avons repris ces expériences avec de l'E.M.A. additionnée de doses de vitamine B_{12} allant de 0,01 à 0,001 γ %, doses trouvées dans les eaux de mer naturelles.

Cinquante nauplii ont été reportés dans chaque milieu, 24 heures après l'éclosion du premier nauplius.

Le tableau 2 indique les % de mortalité enregistrés dans chaque milieu pendant les trois premières semaines de développement. Il paraît évident que l'E.M.A. est dépourvue d'un facteur essentiel aux larves pen-

dant les 2e et 3e semaines de développement, qui correspondent à l'acquisition des 11 paires d'appendices, de l'abdomen et des caractères sexuels secondaires. La vitamine B_{12} diminue très nettement le % de mortalité, puisque nous obtenons des chiffres très inférieurs à ceux enregistrés aussi bien en E.M.A. qu'en E.M.N. témoins. La survie est plus ou moins proportionnelle à la quantité de vitamine ajoutée.

Tableau II.

% de mortalité en fonction du milieu d'élevage et du temps de développement.

Milieux	Jours de développement		
	1-8	8-15	15-22
E.M.N. témoins	11 (± 3)	20 (± 4)	35 (± 2)
E.M.A. témoins	16 (± 2)	65	66
E.M.A. + vit. B_{12} 0,001 γ ‰	6 (± 2)	13 (± 4)	43,5 (± 2)
E.M.A. + vit. B_{12} 0,002 γ ‰	4.00	9 (± 2)	26 (± 12)
E.M.A. + vit. B_{12} 0,005 γ ‰	2 (± 2)	8 (± 6)	35 (± 8)
E.M.A. + vit. B_{12} 0,01 γ ‰	6 (± 2)	8 (± 6)	25,5 (± 6)

Il apparaît donc que la vitamine B_{12}, à des concentrations présentes dans l'eau de mer naturelle, est nécessaire au développement d'*Artemia* et constitue un facteur de cet « élan vital », puisqu'une dose faible trouvée normalement dans certaines eaux exerce une action nettement favorable sur la survie des *Artemia*.

Nous ne pouvons pas dire si l'effet de la vitamine B_{12} est direct ou non, car on peut envisager un effet indirect par le développement de microorganismes dans les milieux d'élevage ou le tube digestif des *Artemia*. Nous nous efforcerons d'éclaircir ce point. Nous pensons cependant que cet effet, soit-il direct ou indirect, conserve une valeur écologique, car si les expériences concernant la productivité, rapportées à un seul maillon de la chaîne alimentaire des océans sont le moyen le plus rigoureux d'aborder le problème, elles ne peuvent à elles seules le résoudre, étant donné la complexité du milieu marin.

Le milieu d'élevage et l'aliment que nous avons utilisé étant très pauvres en vitamine B_{12}, contrairement à ceux utilisés par L. Provasoli et K. Shiraishi [1], nous avons pu mettre en évidence l'effet de la vitamine B_{12}. A la suite de leurs travaux, ces auteurs suggéraient l'importance de la composition qualitative et quantitative de l'eau de mer en vitamines, non seulement sur les populations d'Algues Flagellées nécessitant des vitamines, mais aussi sur le second niveau trophique : les Herbivores. Cette possibilité, envisagée par Putter en 1909, puis postulée par C. E. Lucas, s'avère donc exacte et ouvre de nouvelles perspectives dans l'écologie marine.

Résumé.

L'action de la vitamine B_{12} à des doses existant dans les eaux de mer naturelles a été mise en évidence sur la survie des *Artemia* élevés dans une eau de mer artificielle et nourris par un régime déficient en cette vitamine.

Nous nous efforcerons d'établir si l'effet observé résulte d'une action directe ou indirecte, en utilisant des méthodes d'élevage axénique.

Laboratoires de Physiologie du Muséum et de Physiologie des Etres marins de l'Institut Océanographique.

BIBLIOGRAPHIE

Atz, J. W. (1962). — Some principles and practices of water management for marine aquariums. Fish and Wildlife Serv. U. S., Res. Rep., sous presse.

Brandt, K. (1899). — Uber den Stoffwechsel im Meere Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen. *N. F. Abt. Kiel Bd IV.*

Cowey, C. B. (1956). — A preliminary investigation of the variation of vitamin B_{12} in oceanic and coastal waters. *J. Mar Biol. Ass. U. K.*, **35**, pp. 609-620.

Daisley, K. W. (1957). — Letters to the editors. *Nature*, **180**, n° 4594, pp. 1042-1043.

Daisley, K. W. & Fisher, L. R. (1958). — Vertical distribution of vitamin B_{12} in the sea. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **37**, pp. 683-686.

Droop, M. R. (1957). — Vitamin B_{12} in marine ecology. *Nature*, **180**, n° 4594, pp. 1042-1043.

Dutrieu, J. (1960). — Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'*Artemia salina* Leach. *Arch. Zool. Exp. gen.*, **99**, n° 1.

Edmonson, W. T. (1956). — Factors influencing productivity of fertilized salt water. *Deep Sea Research*, **3**, suppl. 451.

1. Le milieu préparé par ces auteurs contient non seulement de la vitamine B_{12} à un taux élevé (0,05 γ ‰) mais aussi des produits dans la synthèse desquels la vitamine B_{12} est impliquée.

Goodwin, T. W. (1960). — Biochemistry of pigments. The physiology of crustacea, t. 1, Talbot H. Waterman Academic Press, N. Y. and London.

Guillard, R. R. L. & Cassie, V. (1963). — Minimum cyanocobalamin requirements of some centric diatoms. *Limn. Oceanogr.*, **8**, n° 2, pp. 161-165.

Harvey, H. W., Cooper, L. H. N., Lebour, M. V. & Russel, F. S. (1935). — Plancton production and its control. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **20**, n° 2, pp. 407-411.

Iselin, C. O. D. (1939). — Some physical factors which may influence the productivity of New England's coastal waters. *J. Mar. Res.*, **2**, p. 74.

Kashiwada, K., Kakimoto, D., Kasanawa, A. (1960). — Studies of vitamin B_{12} in natural water. *Rec. oceanogr. Works*, Japan, **5**, n° 2, pp. 71-76.

Kirshenblatt, J. D. (1957). — *Travaux Soc. Natur. Leningrad*, **73**, n° 4, p. 225.

Lucas, C. E. (1938). — Some aspects of integration in plankton communities. *J. Cons.*, **13**, pp. 309-322.

Lucas, C. E. (1949). — External metabolites and ecological adaptations *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **3**, pp. 336-356.

Lwoff, A. & Lederer (1935). — Remarques sur l'extrait de terre envisagé comme facteur de croissance pour les Flagellés. *C. R. Soc. Biol.*, **119**, pp. 971-973.

Lwoff, A. & Dusi, H. (1938). — Culture de divers Flagellés leucophytes en milieu synthétique. *C. R. Soc. Biol.*, **127**, pp. 53-55.

Marshall, S. M. & Orr, A. P. (1927). — The relation of plankton to some chemical and physical factors in the Clyde sea area. *J. Mar. Biol. Ass. N. S.*, **14**, p. 837.

Menzel, D. W. & Spaeth, J. P. (1962). — Occurrence of vitamin B_{12} in Sargasso sea. *Limn. Oceanogr.*, **7**, n° 2, pp. 151-154.

Pinkey, K. G. (1930). — Tyrosinase in crustacean blood. *J. Exp. Biol.*, **7**, pp. 19-36.

Provasoli, L., Pintner, I. J. (1953). — Ecological implications of in vitro nutritional requirements of algal flagellates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56**, pp. 839-851.

Provasoli, L. Shiraishi, K., Lance, J. R. (1959). — Nutritional idiosyncrasies of *Artemia* and *Tigriopus* in monoxenic culture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **77**, pp. 250-261.

Provasoli, L. & Shiraishi, K. (1959). — Axenic cultivation of the brine shrimp *Artemia salina*. *Biol. Bull.*, **117**, n° 2, pp. 347-355.

Provasoli, L. (1960). — Growth factors in unicellular marine algae. Perspectives in marine biology. Buzzati Traverso ed., pp. 385-403.

Riley, A. G. (1957). — Seasonal fluctuations of the phytoplancton population in New England coastal waters. *J. Mar. Res.*, **6**, p. 114.

Tozawa, H. & Sagara, J. (1962). — On the vitamin B_{12} metabolism of Bivalves. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **27**, n° 8, pp. 785-788.

Wilson, D. P. (1954). — The attractive factor in the settlement of *Ophelia bicornis* Savigny. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **33**, pp. 361-380.

Wood, E. J. F. (1956). — Considerations on productivity. *J. Cons. Expl. Mer*, **21**, p. 280.